



**Optimización de las condiciones de interacción de
Yersinia enterocolitica con
nanopartículas magnéticas funcionalizadas**

Optimización das condicións de interacción de *Yersinia enterocolitica* con
nanopartículas magnéticas funcionalizadas

Optimization of the interaction conditions of *Yersinia enterocolitica* with
functionalized magnetic nanoparticles

Celia Hernández González

Febrero, 2018

Optimización de las condiciones de interacción de *Yersinia enterocolitica* con nanopartículas magnéticas funcionalizadas

Optimización das condicións de interacción de *Yersinia enterocolitica* con nanopartículas magnéticas funcionalizadas

Optimization of the interaction conditions of *Yersinia enterocolitica* with functionalized magnetic nanoparticles

Celia Hernández González

Máster en Biotecnología Avanzada, Facultad de Ciencias, UDC



A Coruña, febrero de 2018

El Dr. Carlos Jiménez González y el Dr. Jaime Rodríguez González, en calidad de tutores de este trabajo, firman y autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Visto Bueno del tutor/es,

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA) por permitirme utilizar las instalaciones para realizar este trabajo. A mis tutores, Carlos Jiménez González y Jaime Rodríguez González, por su tiempo y dedicación a la corrección del mismo, siempre desde un punto de vista que me ha permitido aprender de los errores. Y a Diana Martínez Matamoros, por su disponibilidad y ayuda en todo momento tanto en el aspecto práctico como teórico.

INDICE

1) Introducción.....	1
1.1) Interés en la detección de bacterias potencialmente patógenas como <i>Yersinia enterocolitica</i>	1
1.2) Aplicaciones de las nanopartículas magnéticas (MNPs).....	4
1.2.1) Ventajas de las MNPs	10
1.2.2) Funcionalización de superficie de las MNPs	12
1.3) Utilización de sideróforos para la detección bacteriana.....	15
1.3.1) Conjugación de MNPs con el sideróforo ferrioxamina.....	16
2) Objetivos	18
3) Materiales y métodos	19
3.1) Reactivos y equipos.....	19
3.2) Ensayo de interacción.....	19
4) Resultados y Discusión.....	22
4.1) Estudio del efecto del tiempo de interacción	22
4.2) Estudio del efecto de la temperatura	24
4.3) Estudio del efecto de la fuerza iónica.....	26
4.4) Estudio del efecto de la concentración de MNPs.....	28
5) Conclusiones	30
6) Bibliografía	31

1) Introducción

1.1) Interés en la detección de bacterias potencialmente patógenas como *Yersinia enterocolitica*

Existen numerosas bacterias patógenas que duplican su población en muy poco tiempo y son capaces de contaminar agua potable y alimentos e incluso llegar a causar infecciones graves, como es el caso de las enterobacterias *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* (Chen *et al.*, 2013). *Yersinia enterocolitica* es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza en reservorios acuáticos y animales, como el cerdo en el caso de algunas cepas patógenas humanas. Puede llegar a ocasionar infecciones gastrointestinales como la enteritis, la enterocolitis, la linfadenitis mesentérica y la ileítis terminal (Grützkau *et al.*, 1990) por ingestión de estos microorganismos en alimentos o agua contaminada entre otros (Bottone, 1997).

En general las infecciones entéricas suponen un alto coste económico (Buzby, Roberts, 2009; Chung *et al.*, 2011) y, debido a que las bacterias están desarrollando resistencia a los antibióticos, la amenaza de enfermedades infecciosas está aumentando de forma drástica y global (Bohara *et al.*, 2017). Por ello, el desarrollo de métodos de detección más simples, rápidos y fiables, que logren una identificación más eficaz de las bacterias resulta prioritario desde una perspectiva genérica de salud pública y seguridad (Kearns *et al.*, 2017). Supondrían además un gran avance en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, en la detección de agentes causales en el suministro de alimentos y agua, en la prevención de riesgos biológicos o actividades bioterroristas, en los estudios forenses microbianos y en los estudios ambientales, entre muchos otros (Kim *et al.*, 2012; Bohara, Pawar, 2015; Houhoula *et al.*, 2017).

Es por esto que muchos investigadores han centrado sus estudios en la detección bacteriana, y concretamente, en la detección a partir de nanopartículas magnéticas (*Magnetic NanoParticles*, MNPs), logrando algunos resultados prometedores. Entre ellos, Chung y colaboradores, consiguieron la detección de bacterias gram-positivas con nanopartículas magnetofluorescentes. Mostraron que la detección era específica, selectiva, rápida y biocompatible y que, además, podía adaptarse a la detección de patógenos intracelulares

(Chung *et al.*, 2011). En otro estudio, de Liu y colaboradores, se consiguió la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la captura de afinidad con nanopartículas magnéticas funcionales combinadas con la técnica de análisis MALDI-MS. Conjugaron las nanopartículas magnéticas a la fosfoproteína ovoalbúmina de paloma inmovilizada para utilizarlas como sondas de afinidad contra dicha bacteria en muestras complejas (Liu *et al.*, 2009). En otro trabajo, Joo y colaboradores desarrollaron un ensayo simple, rápido y rentable combinando la separación inmuno-magnética con técnicas de detección óptica para la captura de *Salmonella* en una solución de tampón o leche. Unieron además nanocristales de TiO₂ (TN) conjugados con anticuerpos a los complejos MNP-bacteria, lo que aumentó la absorción de la luz cerca de 230 nm logrando ventajas sobre los métodos convencionales. La medición es más rápida porque no requiere procesos de cultivo celular y la inmunosensibilidad basada en la absorción de luz de las TN es más económica y menos peligrosa que los métodos de detección convencionales basados en nanopartículas de fluorescencia o nanopartículas de oro (Joo *et al.*, 2012).

También teniendo en cuenta que la identificación y cuantificación de patógenos para el diagnóstico clínico, el monitoreo ambiental y la inocuidad de los alimentos son cruciales para la protección de la salud pública, Wan y colaboradores crearon una matriz de sensores que contiene tres nanopartículas magnéticas cuaternizadas (q-MNP) con sistemas de polímeros fluorescentes. Las membranas celulares bacterianas interrumpen el polímero fluorescente-q-MNP, generando una matriz de respuesta de fluorescencia que pudieron combinar con la medición UV-VIS y así identificar con éxito ocho muestras diferentes de patógenos con una precisión del 96.8 % (Wan *et al.*, 2014). En otro ejemplo, Varshney y colaboradores lograron una separación inmunomagnética con conjugados de nanopartículas magnéticas y anticuerpos para la detección de *Escherichia coli* O157: H7 en muestras de carne (Varshney *et al.*, 2005). En el caso del grupo de investigación de Kaittanis, funcionalizaron nanopartículas de óxido de hierro superparamagnéticas para la cuantificación de bacterias como *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis* (MAP) en muestras clínicas y ambientales. Sus resultados indicaron que las nanopartículas se unían específicamente a MAP, que permitían una cuantificación rápida y con alta sensibilidad en leche y sangre, y que además no eran susceptibles a las interferencias causadas por otras bacterias (Kaittanis *et al.*, 2007). Otro estudio, de Bromerg y colaboradores, demostró una nueva especie de unión a endotoxinas y ADN basada en nanopartículas de

cobalto o magnetita superparamagnéticas funcionalizadas con un polímero de poly-hexametileno biguanida (PHMBG). Las nanopartículas se unían eficientemente a *E. coli* y se podían usar como potentes bactericidas o para separar las células eficazmente de la suspensión usando un imán (Bromberg *et al.*, 2010).

Los resultados del trabajo de Wang y colaboradores han demostrado también la viabilidad de las nanopartículas magnéticas recubiertas de plata para lograr una detección bacteriana efectiva, mejor que la de las nanopartículas de plata utilizadas convencionalmente. La eficacia de sus nanopartículas de MnZn-ferrita recubiertas de plata (MZF@Ag) también se determinó para muestras de plaquetas sanguíneas, demostrando potencial para garantizar la seguridad del producto sanguíneo (Wang *et al.*, 2011). En otro estudio, Huy y colaboradores, prepararon un conjugado de proteína A y nanopartículas magnéticas de óxido de hierro recubiertas de quitosano para la separación de *Vibrio cholerae* a bajas concentraciones en muestras de agua. En este caso, la funcionalización de nanopartículas con quitosano no solo permitió la incorporación de grupos amina en la superficie de las nanopartículas, sino que también añadió una carga positiva al sistema, propiciando la detección (Huy *et al.*, 2014).

1.2) Aplicaciones de las nanopartículas magnéticas (MNPs)

Con la intención de desarrollar nuevos materiales y con ellos procesos más eficientes, las ciencias actuales basan numerosos estudios en la nanobiotecnología y en concreto en la interacción entre materiales a nanoescala (como nanopartículas, nanocables, nanofibras y nanotubos) y entidades biológicas, como pueden ser las bacterias (Pan *et al.*, 2012; Cristea *et al.*, 2017). Una técnica muy novedosa ha sido la aplicación de nanopartículas en el aislamiento y la separación de muchas sustancias químicas y biológicas, sobre todo cuando la concentración de las mismas es baja. En el caso del uso de MNPs para la captura de bacterias separándolas del resto de componentes en muestras de alimentos o agua, la técnica generalmente se realiza a través de la aplicación de un campo magnético (Bohara, Pawar, 2015; Liana *et al.*, 2017). Este es un tema de estudio cuyo interés y aplicación ha aumentado en los últimos años, como se puede observar en la **Figura 1**, que refleja el incremento en la producción de artículos científicos relacionados con nanopartículas magnéticas en el repositorio web *PubMed*.

Las nanopartículas magnéticas son materiales que se caracterizan por presentar tamaños controlados, biocompatibilidad y capacidad de responder a la aplicación de un campo magnético (Bohara *et al.*, 2016). Sus estructuras están constituidas por un núcleo de material magnético que puede ser de hierro (Smolensky *et al.*, 2011), cobalto (Meng *et al.*, 2011) o níquel (Kale *et al.*, 2012), además de otras aleaciones existentes y pudiendo estar combinados o formados por óxidos (Niemirowicz *et al.*, 2012). Su superficie puede modificarse con gran variedad de sustancias como proteínas, anticuerpos y moléculas bioactivas, entre otras (Cristea *et al.*, 2017).

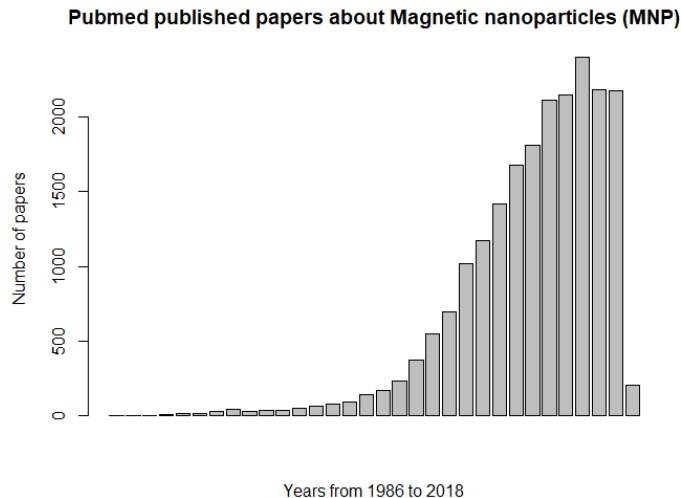


Figura 1. Gráfico del incremento en el número de publicaciones científicas sobre nanopartículas magnéticas desde el año 1986 hasta el 2018.

Gracias a los avances en nanotecnología las MNPs pueden producirse con morfologías específicas y adaptar sus superficies con el fin de manipular sus características y poder aplicarlas de formas más concretas (Bohara *et al.*, 2016). El núcleo de material magnético y el revestimiento pueden elegirse dependiendo de las aplicaciones previstas o, dicho de otro modo, se pueden conseguir diferentes tipos de aplicaciones mediante una modificación superficial que logre su estabilización, un direccionamiento específico y el reconocimiento de especies bioquímicas concretas. Para ello, se pueden usar diferentes estrategias y diferentes materiales, dividiéndose principalmente en inorgánicos (por ejemplo sílice u oro) u orgánicos (fosfolípidos, ácidos grasos, polisacáridos, péptidos, polímeros) (Cristea *et al.*, 2017), como se observa en la **Figura 2**.

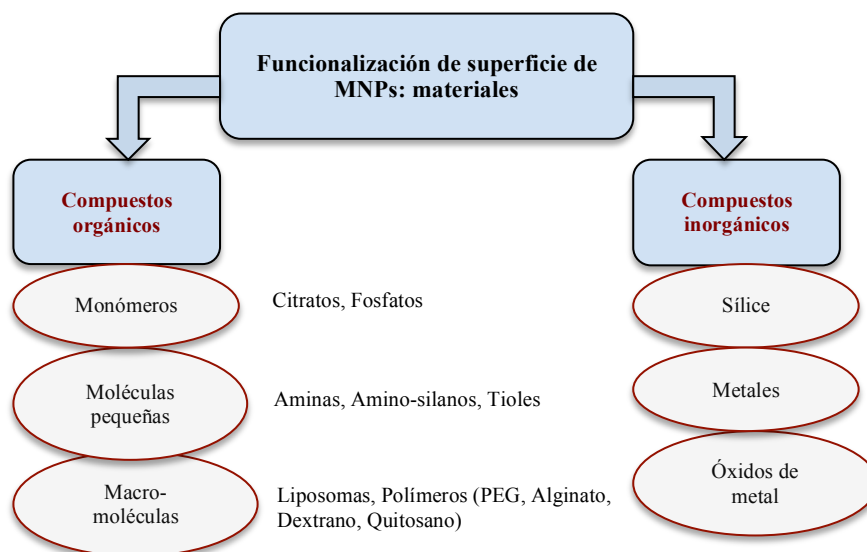


Figura 2. Posibles materiales utilizados para la modificación superficial de las nanopartículas magnéticas (Bohara *et al.*, 2016).

En este trabajo en concreto, se emplearon nanopartículas de Fe_3O_4 , un mineral conocido como magnetita (Mamani *et al.*, 2014), porque son biocompatibles y permiten ser recubiertas de sílice y por tanto funcionalizadas o modificadas. La sílice generalmente actúa proporcionando un andamio en el que poder crear variaciones adaptadas en los grupos funcionales de superficie tales como grupos amino (NH_2), ácido carboxílico (COOH) y metilo (CH_3), así como variaciones en su carga superficial (Liana *et al.*, 2017).

Existen estudios previos en los que ya se han explorado diversas modificaciones de MNPs y se ha logrado una detección efectiva. En uno de ellos, Bohara y colaboradores, utilizaron nanopartículas de ferrita de cobalto funcionalizadas para la captura y detección de patógenos y observaron que la presencia del grupo amino en la superficie de las MNP mostraba afinidad no específica y podía capturar bacterias como *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Bohara *et al.*, 2017). En otro estudio, Jin y colaboradores, utilizaron nanopartículas de óxido de hierro modificado con aminoácidos (Jin *et al.*, 2014). Chen y su grupo, lograron realizar captura de bacterias utilizando nanopartículas magnéticas de óxido de hierro fluorescente con modificación con gentamicina (Chen *et al.*, 2013). Gao y colaboradores, presentaron lo que resultó ser el primer artículo que utilizaba MNPs para separar la comunidad microbiana de una matriz ambiental compleja (Gao *et al.*, 2016). En otro

estudio, Bohara y Pawar utilizaron MNPs para detectar y extraer rápidamente *E. coli* y, como se muestra en la **Figura 3**, pudieron visualizar por microscopía electrónica de barrido (SEM) la unión bacterias-MNPs (Bohara, Pawar, 2015).

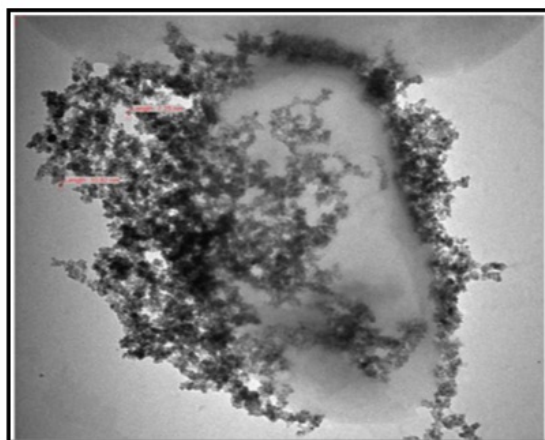


Figura 3. Imagen de MNPs unidas a *E. coli* (Bohara, Pawar, 2015).

En otra investigación, Mezger y colaboradores trataron de proponer una nueva solución para la identificación rápida de bacterias en muestras de orina, basándose en la amplificación por círculo rodante (RCA) y nanopartículas magnéticas, y destacaron que el mismo conjunto de MNP funcionalizadas se podía utilizar para leer multitud de productos (Mezger *et al.*, 2015). Y otro ejemplo, de Borsa y colaboradores, fue un ensayo basado en la medición de actividad nucleasa exógena específica de *Staphylococcus aureus* para la detección de la bacteria directamente a partir de muestras de sangre. La interferencia de los componentes sanguíneos para la cuantificación fluorescente se eliminó mediante una prepurificación con nanopartículas magnéticas de sílice funcionalizadas con aptámeros. Una ventaja del método presentado en dicho trabajo es que la separación magnética y la lectura fluorescente podrían incorporarse fácilmente a sistemas automatizados portátiles (Borsa *et al.*, 2016).

Los anteriores ejemplos demuestran que las nanopartículas magnéticas están ganando mucho interés (**Figura 1**) de cara a múltiples funciones debido, entre otras cosas, a su capacidad para ser manipuladas con la aplicación de un campo magnético. Pero factores tales como la biocompatibilidad, la baja toxicidad, la eficacia de la focalización *in vivo* e *in vitro* y

la estabilidad a largo plazo, deben tenerse también en cuenta con respecto a sus posibles usos. Además, existe una demanda creciente de funcionalización eficiente y versatilidad para las MNPs destinadas a bioaplicaciones, que exigen un control estricto sobre el tamaño, la estructura y las propiedades de superficie, entre otras. Por ello, el diseño de MNPs con revestimientos multifuncionales y eficaces es un área en rápido progreso y se está investigando en consecuencia (Bohara *et al.*, 2016).

Una de las bioaplicaciones más relevantes se da en el ámbito clínico, en que las nanopartículas magnéticas se han convertido en una posible herramienta para detectar células cancerosas, mediante la mejora del contraste de imágenes por resonancia magnética (MRI) y la termoterapia dirigida. El tamaño y la superficie modificada de las MNPs permiten una aplicación segura en los tumores y una alta eficiencia de calentamiento, resultando prometedoras en el ámbito terapéutico y dando lugar a tratamientos mucho más selectivos que la quimioterapia tradicional e incluso la hipertermia convencional. Además, las MNPs pueden dirigirse y/o concentrarse magnéticamente sólo en el tejido diana, permitiendo tratamientos de hipertermia repetidos y más concentrados (Laurent *et al.*, 2011).

Es el caso de estudios como el de Thorat y colaboradores, que lograron desarrollar nanopartículas magnéticas $\text{La}_{0.7}\text{Sr}_{0.3}\text{MnO}_3$ (LSMO) altamente dispersables en agua y biocompatibles, efectivas en el tratamiento hipertérmico del cáncer. Observaron que las partículas de LSMO recubiertas con OA-betaína formaban una suspensión estable en medios fisiológicos, eran compatibles con líneas celulares (HeLa y L929) y no tenían efectos tóxicos *in vivo*. En concreto, pudieron inyectar un líquido que contenía las nanopartículas magnéticas directamente en los tumores y, al colocarlas en un campo magnético con frecuencias similares a las de las señales de radio FM, las nanopartículas generaban calor y destruían los tumores. Este es un ejemplo de procedimiento mínimamente invasivo que evita el calentamiento innecesario de los tejidos sanos circundantes (Thorat *et al.*, 2013). En otra de sus investigaciones, usaron nanopartículas de óxido de hierro encapsuladas en una matriz de vesículas de polímeros de polietilenglicol (IONP) y lograron la carga simultánea del fármaco quimioterapéutico y su liberación *in vitro* en células cancerosas (Thorat *et al.*, 2016). Otro estudio, de Hadjipanayis y colaboradores, se basa en la dificultad para administrar nanopartículas a los tumores intracraneales. Mostraron que las nanopartículas de óxido de

hierro (IONP) conjugados con un anticuerpo purificado se unían selectivamente al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mutante por delección presente en los tumores humanos de glioblastoma multiforme, proporcionando una mejora en el contraste de MRI de las células tumorales (Hadjipanayis *et al.*, 2010).

Por otro lado, la interacción de las bacterias con las superficies resulta también importante, presentando implicaciones relevantes en otras áreas y en el propio diseño de métodos de detección bacteriana. Muchas de las interacciones producen cambios en la expresión de los genes que influyen en la morfología y el comportamiento de las células, incluidos los genes esenciales para la motilidad, la fijación a la superficie o la captación de metabolitos necesarios (como el hierro). A pesar de esto, los sistemas bacterianos utilizados para detectar y responder a las superficies aún no se conocen bien. La verdadera comprensión de estos mecanismos guiará el desarrollo de nuevas clases de materiales más específicos, como ocurre en el caso de las MNPs funcionalizadas (Tuson, Weibel, 2013).

1.2.1) Ventajas de las MNPs

Las nanopartículas magnéticas resultan prometedoras por presentar una serie de características que se traducen en diversas ventajas. La más destacable es el superparamagnetismo, que las hace responder a un campo magnético y que posibilita una fácil manipulación externa, actuando incluso a cierta distancia (**Figura 4**). Es esta atracción magnética la que permite que también sean utilizadas para la bioseparación, incluyendo la separación celular y la purificación. La magnetización es debida a lo que se conoce como momento magnético único, suma de todos los momentos magnéticos individuales de los átomos de la nanopartícula que, al poder ser controlado, les permite actuar como agentes de contraste en resonancia magnética y como mediadores de calentamiento para la termoterapia del cáncer, como se mencionó anteriormente (Pan *et al.*, 2012; Cristea *et al.*, 2017).

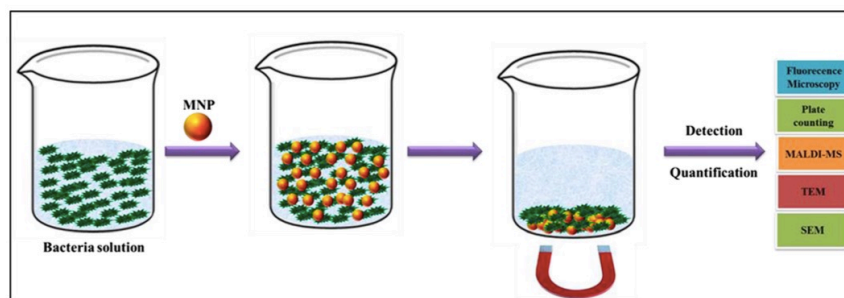


Figura 4. Separación de bacterias unidas a nanopartículas magnéticas mediante el uso de un campo magnético externo (Bohara, Pawar, 2015).

El tamaño es otra de las ventajas importantes. Éste generalmente oscila entre unos pocos hasta decenas de nanómetros, lo que los sitúa en dimensiones más pequeñas o comparables a las de un virus, una proteína o un gen, y que les facilita la aproximación a una entidad biológica de interés (Bohara *et al.*, 2016). Además, resulta fácil de optimizar según el propósito de aplicación y les permite, a diferencia de las micropartículas, sufrir endocitosis para entrar en las células (**Figura 5**) y manipular orgánulos subcelulares u otras dianas de una forma sin precedentes. Otra característica es que presentan proporciones de superficie-volumen mucho mayores que las de las micropartículas, lo que incrementa la afinidad entre las MNP funcionalizadas y sus dianas (Pan *et al.*, 2012). Debido a esto, las MNPs son ejemplo de un bionanomaterial que, al imitar el tamaño de las moléculas en la naturaleza y presentar estas

características, está revolucionando la investigación y los posibles futuros diagnósticos (Bohara, Pawar, 2015).

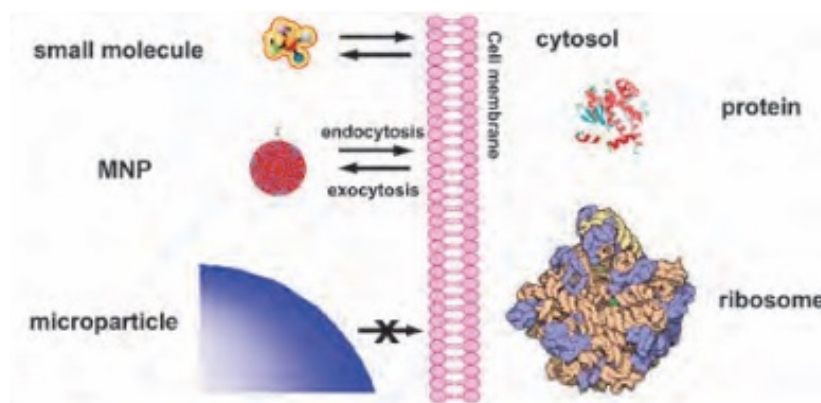


Figura 5. Capacidad de las MNPs para atravesar la pared celular por endocytosis, en comparación con las micropartículas (Pan *et al.*, 2012)

Los primeros métodos convencionales para la detección de patógenos bacterianos se basaban en técnicas microbiológicas destinadas a aislar el organismo (Bai *et al.*, 2016) a partir del análisis morfológico y bioquímico, lo que requiere procesos intermedios como extracción, aislamiento, cultivo, recuento, etc., que hacen el diagnóstico más tedioso y difícil (Bohara, Pawar, 2015). Pero actualmente, debido a dichas características ventajosas, se han iniciado estudios con MNPs modificadas que permiten una captura fácil de bacterias y biomoléculas a partir de mezclas complejas. Algunos resultados de estudios (Bai *et al.*, 2016) que lo demuestran son: nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice para extraer y purificar ADN genómico (Taylor *et al.*, 2000); nanopartículas magnéticas recubiertas de sílice modificadas con grupos amino para separar patógenos bacterianos (Huang *et al.*, 2010); nanopartículas magnéticas conjugadas con pequeñas moléculas orgánicas o biomoléculas como manosa (El-Boubbou *et al.*, 2007), quitosano (Honda *et al.*, 1998) o aptámeros (Ozalp *et al.*, 2014) para separar bacterias y virus; o nanopartículas magnéticas marcadas con oligonucleótidos utilizadas para capturar secuencias de ácidos nucleicos diana (Ashtari *et al.*, 2005).

1.2.2) Funcionalización de superficie de las MNPs

La estrategia de detección basada en MNPs tiene muchas ventajas que a gran escala se traducen en gran compatibilidad con biomoléculas, fácil producción, mejor sensibilidad, un límite de detección más bajo, menos ruido y un análisis más rápido (Lan *et al.*, 2017). Sin embargo, hay que tener en cuenta que las nanopartículas magnéticas en su forma nativa no son específicas, por lo que no son adecuadas para la aplicación en matrices complejas. Este inconveniente se puede superar mediante lo que se conoce como funcionalización de superficie (Cristea *et al.*, 2017), es decir, la adición de un grupo funcional químico en la superficie de las MNPs que genera modificaciones que las convierte en estructuras compatibles y útiles para aplicaciones biológicas. Pueden estar recubiertas con biomoléculas para interactuar con una entidad biológica o unirse a ella, proporcionando así un medio controlable y más fácil de "etiquetar" y/o abordar (Bohara *et al.*, 2016).

La funcionalización es un proceso que resulta imprescindible por tres razones principales. En primer lugar, por sus tamaños nanométricos y las altas proporciones de superficie-volumen que hacen que sean altamente activas, se requiere disminuir su energía superficial para mantener la estabilidad química adecuada. En segundo lugar, las ventajas de las MNP sólo aparecen cuando se dispersan bien en solución y se previene la formación de agregados, al menos antes de interactuar con los objetivos diana. Y, en tercer lugar y lo más importante, deben llevar un ligando o ligandos específicos para la mayoría de aplicaciones. En este sentido, y debido a que las MNPs pueden tender a agregarse y causar uniones no específicas, se hace imprescindible el uso de interacciones ligando-receptor lo más específicas posible para que las MNP se unan en este caso a las células bacterianas, lo cual no sólo asegure una alta eficiencia, sino también minimice dicha agregación inespecífica (Pan *et al.*, 2012).

Actualmente se conoce que las nanopartículas magnéticas pueden resultar muy útiles en funciones como la hipertermia magnética, la resonancia magnética, la administración de fármacos, la detección de bacterias, el etiquetado celular, la separación magnética y el enriquecimiento del ADN (Bohara *et al.*, 2016). Con respecto a la detección bacteriana, son las posibles combinaciones de MNPs funcionalizadas las que permitirán desarrollar nanomateriales multifuncionales para su detección y rápida eliminación, consiguiendo una vía

atractiva e innovadora en el diagnóstico de patógenos (Liana *et al.*, 2017). También se ha observado que se puede utilizar una única nanopartícula modificada para dirigir y aislar muchos patógenos diferentes, lo que resulta interesante porque evitaría la necesidad de preparar nanopartículas específicas para cada caso (Bohara, Pawar, 2015), ahorrando tiempo y costes.

En relación al uso de MNPs para las aplicaciones biológicas los principales problemas que se presentan son: a) la poca estabilidad de las MNP en agua, ya que la mayoría de los procesos bioquímicos ocurren en un ambiente acuoso, b) la salud y seguridad, mientras son explorados aun los efectos o toxicidad de las MNP en el cuerpo humano y el medio ambiente, c) la conjugación de MNPs a moléculas biológicas bien definidas según la naturaleza de las nanopartículas y el tipo de aplicación. Debido a esto, la funcionalización superficial de las MNP debe abordarse, cuando se pasa del estudio experimental a la práctica real, teniendo en cuenta el objetivo de lograr la estabilidad en medios biológicos complejos, la no toxicidad (Arvizo *et al.*, 2012) y la especificidad para biomoléculas, células y tejidos particulares. Se deben considerar exhaustivamente además otras propiedades como la eficiencia, la seguridad y la economía, así como la multifuncionalidad (Bohara *et al.*, 2016). Para lograrlo se requieren modificaciones que son las que las convierten en materiales hidrofílicos, bioespecíficos y biocompatibles (**Figura 6**) (Bohara *et al.*, 2016).

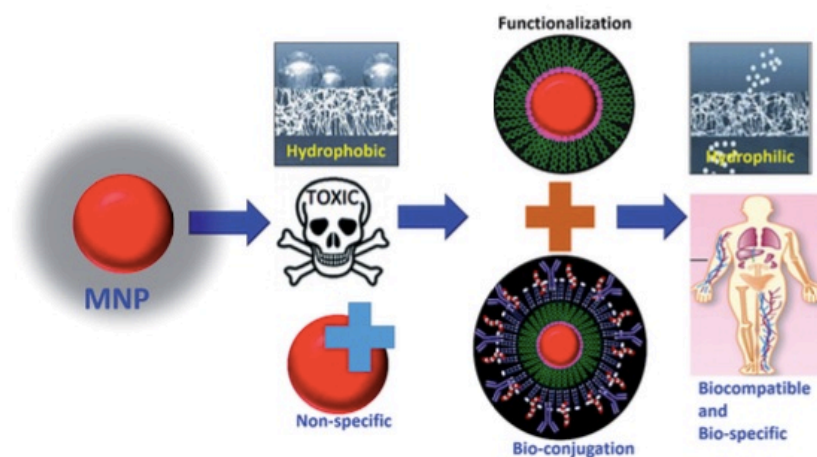


Figura 6. Inconvenientes y transformaciones necesarias para el uso de MNPs en aplicaciones biológicas (Bohara *et al.*, 2016).

Dichas modificaciones de funcionalización de superficie (**Figura 6**) intentan aproximarse a las siguientes propiedades ideales (Bohara *et al.*, 2016):

- Evitar que las MNPs se agreguen y conducir a una mejor estabilidad coloidal
- Aumentar la compatibilidad con el agua
- Promover un mejor control magnético
- Proteger y estabilizar la superficie de las MNPs
- Hacer las MNPs biocompatibles y no tóxicas, sobre todo cuando estén destinadas a aplicaciones biológicas y médicas
- Proporcionar grupos funcionales que permitan anclar sustancias bioactivas para aplicaciones biológicas

Con respecto a la toxicidad de las MNPs, algunos grupos ya han mostrado preocupación por su estudio. Lam y colaboradores (Lam *et al.*, 2004) y Warheit y colaboradores (Warheit *et al.*, 2004) fueron los primeros en realizar evaluaciones toxicológicas comparativas de nanopartículas de cuarzo y nanotubos. También el grupo de Hussain estudió la toxicidad de varios tipos de nanopartículas de óxido de metal (TiO_2 , Fe_3O_4 y MoO_3) en células de hígado de rata, cuyos resultados indicaron que el efecto de la toxicidad se debía principalmente a la concentración y la composición química de las nanopartículas (Hussain *et al.*, 2005). También Gurr y colaboradores, informaron de que las partículas ultrafinas de TiO_2 exhibían una fuerte citotoxicidad cuando se exponían a la radiación UVA (Gurr *et al.*, 2004). En general, aunque la información sobre la toxicidad de las nanopartículas de óxido metálico continúa aumentando, todavía existe una importante brecha de conocimiento sobre el perfil toxicológico completo de las mismas (Jeng, H. A., Swanson, J., 2006).

1.3) Utilización de sideróforos para la detección bacteriana

Para que ocurra la detección bacteriana más específica posible, las nanopartículas magnéticas se funcionalizan con moléculas de bioreconocimiento (Bohara *et al.*, 2016). Varios grupos de investigación ya han demostrado aplicaciones prometedoras como es el caso de Gu y colaboradores, que consiguieron que *E. coli* a concentraciones ultrabajas interaccionara con nanopartículas de FePt conjugadas con vancomicina (Gu *et al.*, 2003). O Kell y colaboradores, que desarrollaron una serie de nanopartículas modificadas con vancomicina y las emplearon en ensayos para aislar una variedad de bacterias de una solución acuosa (Kell *et al.*, 2008).

Siguiendo con esta línea de investigación en la detección de bacterias usando MNPs funcionalizadas, una opción que resulta muy interesante es combinarlas con sideróforos. Se trata de intentar aprovechar el sistema de captación de hierro propio de las bacterias (Castillo-Rueda, Khosravi-Shahi, 2010) para conseguir una interacción por reconocimiento molecular entre el conjugado MNP-sideróforo y la bacteria.

La mayoría de las bacterias liberan un quelante de hierro cuando éste está en muy baja concentración, denominado sideróforo, que recuperan una vez se ha unido al hierro a través de un receptor en la membrana celular. Muchas especies suelen producir sideróforos propios que, junto con su receptor, permiten una interacción muy específica. Como se sabe además que las bacterias no pueden mutar fácilmente estos sistemas de captación de hierro sin perder viabilidad, se sugiere que pueden funcionar como ligandos de captura específicos, efectivos e inmutables (Kim *et al.*, 2012).

1.3.1) Conjugación de MNPs con el sideróforo ferrioxamina

Las ferrioxaminas representan un grupo de sideróforos que fueron aislados por primera vez a partir del cultivo de *Streptomyces pilosus* y que también sintetizan algunos géneros de enterobacterias como *Erwinia*, *Pantoea*, *Enterobacter*, *Hafnia* y *Ewingella*. Pueden sintetizar algunos tipos de ferrioxaminas endógenas (E, D y G) ante condiciones de limitación de hierro (Deiss *et al.*, 1998) o, como en el caso de *Yersinia enterocolitica* no ser capaces de sintetizarlas pero sí de captarlas exógenamente, como ocurre con la ferrioxamina B (Falcão, J. P., Falcão, D. P., 2006). Esto indica que existe un gran número de enterobacterias naturales equipadas con los sistemas de biosíntesis y/o captación de ferrioxaminas y que, por tanto, son un grupo de moléculas de gran interés para el diseño de sistemas de detección bacteriana, sobre todo al poder ser combinadas con nanopartículas magnéticas. Pero, aunque resulta muy interesante como posible nueva técnica de detección, cabe destacar que los estudios al respecto todavía son escasos.

En uno estudio previo, Deiss y colaboradores, compararon el reconocimiento molecular de sideróforos con un receptor de ferrioxamina (FoxA) clonado, uno de *Y. enterocolitica* y el otro de *E. herbicola*, observando reconocimiento específico por parte del receptor (Deiss *et al.*, 1998). Otro ejemplo del uso de la ferrioxamina, es el estudio de Kim y colaboradores, en el que desarrollaron un método de detección rápido, cuantitativo y específico para *Y. enterocolitica* en una muestra de agua utilizando el conjugado ferrioxamina-BSA (*bovine serum albumin*) como ligando de captura (Kim *et al.*, 2012).

En este trabajo, se ensaya un conjugado (MNP@SiO₂@NH₂@Fa) utilizando ferrioxamina como sideróforo, para observar si al activar el sistema de captación de hierro en *Yersinia enterocolitica* se consigue una interacción específica, y si variables como tiempo de interacción, temperatura, fuerza iónica o concentración de MNPs pueden modular o no su efecto. Como se observa en la **Tabla 1**, las modificaciones superficiales de los cuatro tipos de MNPs se han realizado siguiendo un mismo patrón. Han sido preparadas y proporcionadas por miembros del grupo de investigación QUIMOLMAT, del Centro de Investigaciones Científicas Avanzadas (CICA), cuyos estudios previos sirven como base para este trabajo. Estudiaron la síntesis de conjugados de sideróforos con MNPs con el objetivo de desarrollar una nueva metodología en el campo de la detección bacteriana. Escogieron sintetizar MNPs de

Fe_3O_4 , recubiertas de SiO_2 y funcionalizadas con grupos amino (**Tabla 1**), sobre las que pudieron acoplar después el sideróforo ferrioxamina (cuya estructura se muestra en la **Figura 7**).

Tabla 1. Acrónimo y composición de cada nanopartícula magnética empleada en este estudio.

MNP	Nanopartículas magnéticas sin recubrir
MNP@ SiO_2	Nanopartículas magn. recubiertas de sílice
MNP@ SiO_2 @ NH_2	Nanopartículas magn. funcionalizadas con grupos amino
MNP@ SiO_2 @ NH_2 @Fa	Nanopartículas magn. conjugadas con ferrioxamina

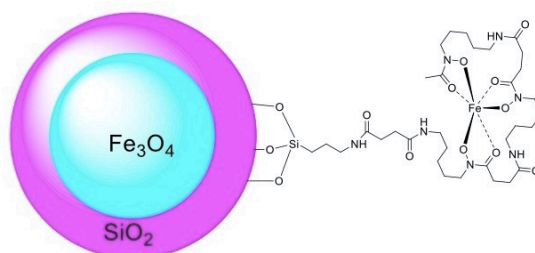


Figura 7. Conjugado de MNP con el sideróforo ferrioxamina.

La elección de magnetita como material para el núcleo de la nanopartícula se debió a sus buenas propiedades magnéticas, su facilidad para controlar la morfología en el proceso de síntesis, su bajo coste y su menor toxicidad con respecto a otros materiales magnéticos. La cubierta de sílice, porque reduce su tendencia a aglomerarse por atracción magnética, aporta una reducción en su toxicidad y además, permite su funcionalización con grupos amino en su superficie a través de un compuesto de tipo aminosilano. Por otro lado, la ferrioxamina resultó fácil de obtener a partir del compuesto comercial deferoxamina B, y el receptor de membrana específico de este sideróforo por ser común en distintos tipos de bacterias. Observaron que el conjugado mostraba resultados prometedores en los ensayos bacterianos con *Yersinia enterocolitica*, mostrando capacidad de extraer de forma mucho más eficiente las bacterias que tenían el receptor de membrana específico del sideróforo ferrioxamina, frente a las que no disponían del receptor.

2) Objetivos

El objetivo general de este trabajo es estudiar y tratar de optimizar la interacción de *Yersinia enterocolitica* con diferentes tipos de nanopartículas magnéticas (MNPs) funcionalizadas. Para lograrlo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto del tiempo de interacción, la temperatura, la fuerza iónica, y la concentración de nanopartículas en la interacción de cuatro tipos de nanopartículas (MNP, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ y MNP@SiO₂@NH₂@Fa) con *Yersinia enterocolitica* WC-A.
- Determinar las condiciones en las que la especificidad del conjugado MNP@SiO₂@NH₂@Fa frente a *Yersinia enterocolitica* aumenta en comparación con las otras nanopartículas.

3) Materiales y métodos

3.1) Reactivos y equipos

Los cuatro tipos de MNPs utilizadas en este trabajo (**Tabla 1**) fueron sintetizadas y proporcionadas por el grupo QUIMOLMAT.

Para la preparación de los cultivos bacterianos de trabajo se utilizó la cepa *Yersinia enterocolitica* WC-A. Se partió de un cultivo incubado 12 horas en medio LB (Luria-Bertani broth) a 37 °C. Posteriormente, se añadieron 50 µL del reactivo 2,2'-bipiridil 0.01 M, para que los cultivos crecieran en condiciones de deficiencia de hierro. Para la medida de la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD₆₀₀) se usaron entre 800 µL - 1000 µL de cada cultivo y se midieron en un espectrofotómetro de microvolumen mySPEC, de VWR Collection.

Para el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), se obtuvieron imágenes de cada placa de cultivo de forma individual con un sistema de fluorescencia y quimioluminiscencia ChemiDoc™ XRS+, de BIO-RAD. Para preparar las placas se utilizó TSA (*Trypticase Soya Agar*, de Aldrich) y una cabina de flujo laminar de seguridad tipo I para evitar contaminaciones. Todos los medios usados se prepararon con agua destilada y esterilizados en un autoclave durante 15 minutos a 121 °C y a una presión de 1,5 bar. Todo el proceso de atracción magnética-lavados-resuspensión-diluciones-plaqueo se llevó a cabo en condiciones estériles en una cabina de flujo laminar de seguridad tipo II.

3.2) Ensayo de interacción

En el presente estudio, la capacidad de las nanopartículas para capturar bacterias se estudió usando *Yersinia enterocolitica* como microorganismo modelo, concretamente la cepa de tipo salvaje WC-A. Los cultivos se prepararon a partir de la cepa conservada a - 80 °C, y las bacterias se reactivaron en 3 mL de medio LB y se incubaron durante 12 horas a 37 °C. A continuación, a partir 50 µL del cultivo anterior se prepararon 5 mL de cultivo en medio LB, con la adición de 50 µL de 2,2'-bipiridil (0.01 M), y se dejó en agitación durante aproximadamente 3 horas a 37 °C. La concentración bacteriana se monitoreó por medio de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) hasta alcanzar un rango de 0.6 - 0.8, para obtener cultivos de una concentración aproximada de 6×10^8 UFC / mL.

A partir de este cultivo se preparó una dilución 1:100 en 1 mL de tampón fosfato salino (PBS) pH 7.8 en 4 tubos diferentes según el tipo de nanopartícula (etiquetados como “MNP”, “SiO₂”, “NH₂” y “Fa”, como se muestra en la **Figura 8B**). En los tubos correspondientes se agregaron en el caso de la variable tiempo de interacción, 100 µg de cada MNP (MNPs 1 mg / mL), en tampón PBS, a temperatura ambiente (TA) y se dejaron interactuar a tiempo de 10 minutos, 30 minutos o 60 minutos. En el caso de estudio de la variable temperatura, se añadieron 100 µg de cada MNP y se dejaron interactuar durante 30 minutos, en PBS y a temperatura de 4 °C o 37 °C. En el caso del estudio de la variable fuerza iónica la interacción se hizo en tampón PBS con una concentración mayor de NaCl (0.5 M), durante 30 minutos, a TA y añadiendo 100 µg de cada MNP. Por último, para poder estudiar el efecto de la variable concentración de nanopartículas, se añadieron las cantidades de 50 µg, 100 µg, 200 µg ó 300 µg. Se dejaron interactuar en medio PBS, a TA y durante un período de 30 minutos.

En todos los casos, una vez transcurrido el tiempo de interacción, se recuperaron los agregados (MNP-bacterias) mediante atracción magnética con un imán, descartando cuidadosamente el sobrenadante (bacterias no unidas a las MNPs). Los agregados se lavaron dos veces con 1 mL de PBS y se resuspendieron nuevamente en 1 mL de PBS. Finalmente, se sembraron 10 µL en placas TSA (**Figura 8**) en diluciones seriadas de esta suspensión (**Figura 8A**) y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para el posterior recuento de colonias (UFC / mL).

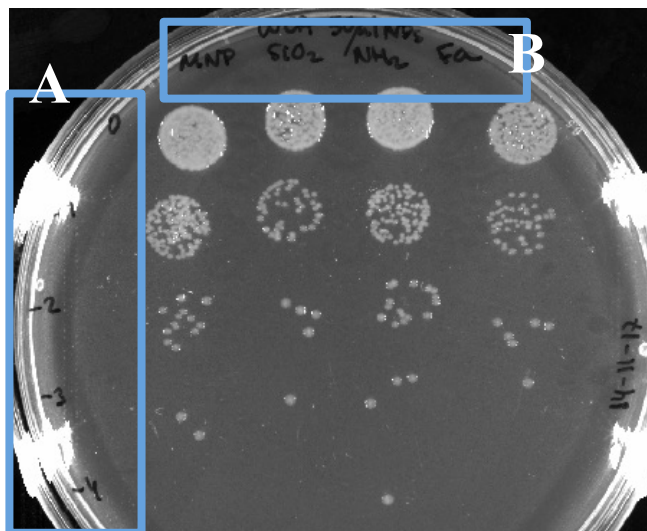


Figura 8. Recuento de UFCs en placa TSA. A) La dilución 1:100 inicial se muestra como dilución 0, a partir de la que se realizan diluciones seriadas 1/10 denominadas respectivamente -1, -2, -3, -4. B) De cada dilución y de cada tipo de MNP (“MNP”, “SiO₂”, “NH₂” y “Fa”) se siembran 10 μ L.

A partir del número de UFCs contadas en cada placa se calculó el número de bacterias resultantes y, por tanto, las que fueron realmente adheridas a las nanopartículas. Los datos obtenidos se representaron en gráficas con el fin de comparar las diferentes condiciones de interacción. Para ello se utilizó el promedio de los datos, ya que cada experimento se realizó por duplicado. Para cada tipo de MNP, se indica la desviación típica de los datos con las barras de error de porcentaje.

4) Resultados y Discusión

4.1) Estudio del efecto del tiempo de interacción

A partir del cultivo bacteriano de *Y. enterocolitica*, con una concentración aproximada de 6×10^8 UFC / mL en medio LB con 2,2'-bipiridil, se preparó una dilución 1:100 y para estudiar el efecto de la variable tiempo de interacción, se añadieron 100 μ g de cada MNP, en tampón PBS, a TA y se dejaron interactuar a un tiempo de 10 minutos, 30 minutos ó 60 minutos. Una vez transcurridos los tiempos de interacción, se recuperaron los agregados (MNPs-bacterias) mediante atracción magnética con un imán, se realizaron 2 lavados con tampón PBS y finalmente se sembraron en placas TSA diluciones decimales seriadas de esta suspensión, que fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas para el posterior recuento de colonias (UFC / mL). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 9**.

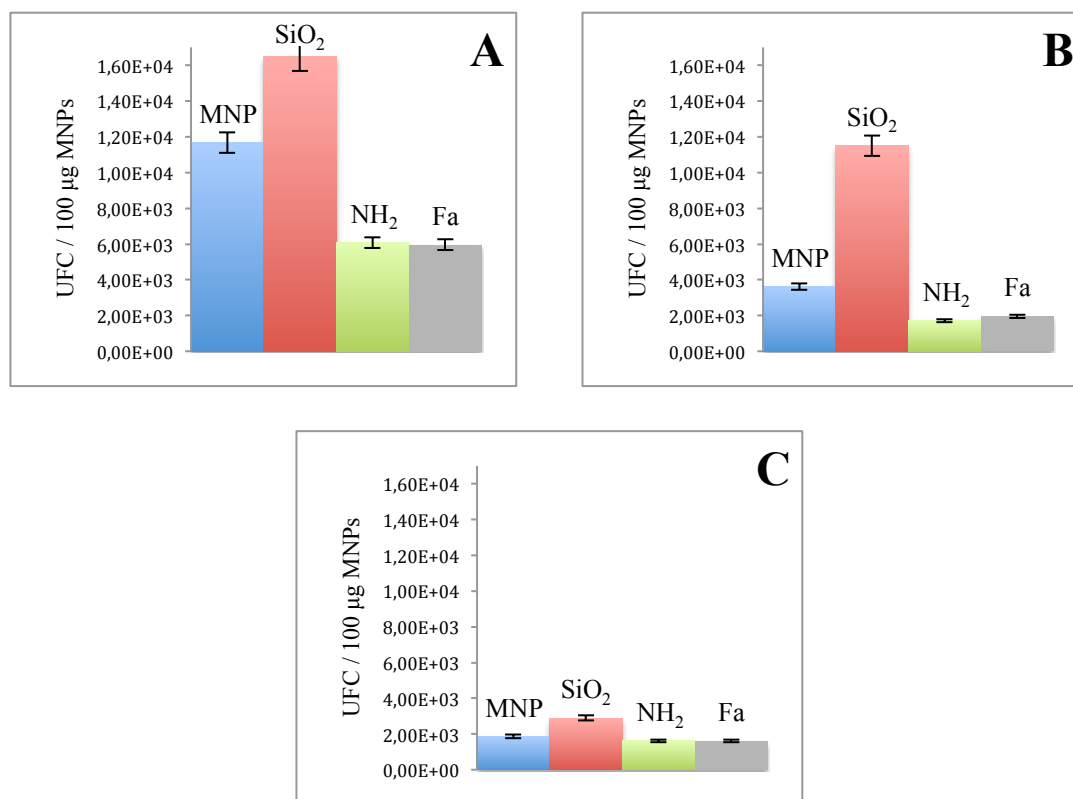


Figura 9. Resultados del ensayo de interacción MNPs-bacterias variando el tiempo de interacción, con 100 μ g de MNPs, en tampón PBS y a TA. A) a 10 minutos, B) a 30 minutos, C) 60 minutos.

A un tiempo de interacción de 10 minutos (**Figura 9A**) se observa que el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$ tiene una afinidad con *Y. enterocolitica* (se unen $5,97 \times 10^3$ UFC / mL) menor que el resto de nanopartículas. $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ presentaría un valor cercano ($6,09 \times 10^3$ UFC / mL), pero las MNP y MNP@SiO_2 presentan una afinidad mayor, sobre todo MNP@SiO_2 ($1,65 \times 10^4$ UFC / mL), lo que en principio indica que ésta presenta una mayor interacción con la bacteria en un tiempo corto de interacción.

A tiempos más largos, de 30 minutos (**Figura 9B**) y 60 minutos (**Figura 9C**), se detecta una disminución de la afinidad de los cuatro tipos de MNPs, con valores del orden de $\times 10^3$ UFC / mL, a excepción de MNP@SiO_2 con un valor de $1,15 \times 10^4$ UFC / mL sólo a 30 minutos. Estos datos podrían estar indicando que transcurrida una hora tiene lugar mayor muerte celular por deficiencia de nutrientes, disminuyendo así el número de bacterias capturadas por parte de las nanopartículas magnéticas.

En general, en los tres tiempos probados (**Figura 9**) las MNP@SiO_2 son las que presentan mayor interacción de todas las nanopartículas, seguidas de las MNP y a continuación de las $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ y $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$. Podría decirse por tanto que en principio, a mayor tiempo de interacción, menor efectividad de captura de bacterias por parte de las MNPs. Y además, que el conjugado MNP-sideróforo ($\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$) no logra mejores resultados de captura que el resto de las nanopartículas.

4.2) Estudio del efecto de la temperatura

A partir del cultivo bacteriano de *Y. enterocolitica*, con una concentración aproximada de 6×10^8 UFC / mL en medio LB con 2,2'-bipiridil, se preparó una dilución 1:100 y para estudiar el efecto de la variable temperatura, se añadieron 100 μ g de cada MNP, en tampón PBS, y se dejaron interactuar 30 minutos a 4 °C ó 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de interacción, se recuperaron los agregados (MNPs-bacterias) mediante atracción magnética con un imán, se realizaron 2 lavados con tampón PBS y finalmente se sembraron en placas TSA diluciones decimales seriadas de esta suspensión, incubadas a 37 °C durante 24 horas para el posterior recuento de colonias (UFC / mL). Los resultados obtenidos en este caso se observan en la **Figura 10**.

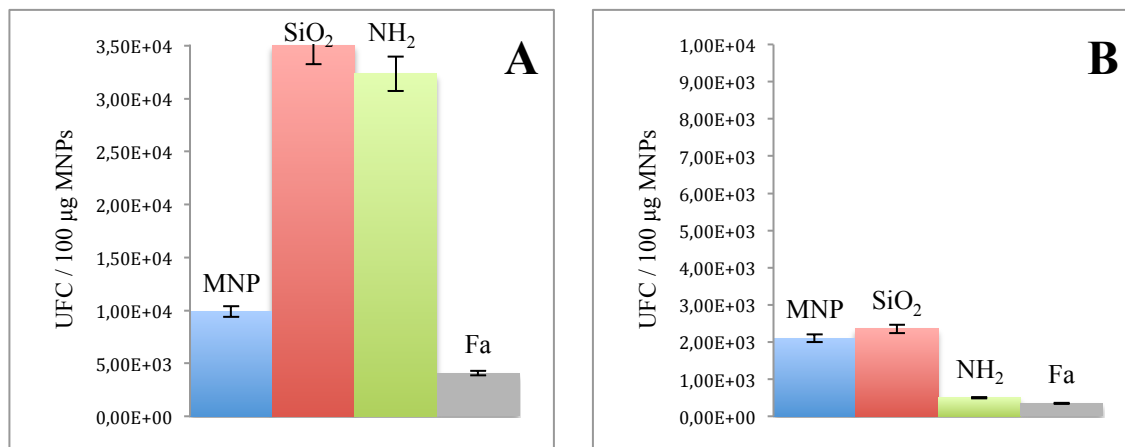


Figura 10. Resultados del ensayo de interacción MNPs-bacterias variando la temperatura, con 100 μ g de MNPs, en tampón PBS, y durante 30 minutos. A) a 4 °C, B) a 37 °C.

Yersinia enterocolitica es capaz de crecer dentro de una amplia escala de temperaturas, desde -1 °C hasta +40 °C, por lo que es posible emplear el rango de temperaturas de este estudio con la intención de observar si aparecen diferencias en los resultados que pudiesen influir en la unión de las MNPs a la bacteria.

En esta ocasión para los 4 tipos de MNPs se obtuvieron en general mejores resultados de interacción con las bacterias a 4 °C (**Figura 10A**). De modo similar al experimento anterior, se observa que la MNP@SiO₂@NH₂@Fa ofrece resultados de interacción bajos en

comparación con el resto de MNPs, con valores de $4,06 \times 10^3$ UFC / mL a 4 °C (**Figura 10A**) y $3,50 \times 10^2$ UFC / mL a 37 °C (**Figura 10B**), y siendo en ambos casos la MNP@SiO₂ la que mayor afinidad presenta, con valores de $3,50 \times 10^4$ UFC / mL (**Figura 10A**) y $2,35 \times 10^3$ UFC / mL (**Figura 10B**). La MNP@SiO₂@NH₂ presenta una importante diferencia, capturándose $3,23 \times 10^4$ UFC / mL a 4 °C y disminuyendo hasta $\times 10^2$ UFC / mL a 37 °C. Las de tipo MNP no muestran una gran diferencia entre ambas temperaturas, aunque también disminuye la captura cuando la temperatura es mayor.

Una posible explicación a los mejores resultados obtenidos a 4 °C respecto a 37 °C podría ser similar a lo que sucede con el estudio de la variable tiempo de interacción. Al disminuir la temperatura, el metabolismo bacteriano podría estar disminuyendo su velocidad, dando lugar en general a una menor muerte celular y aumentando así el número de UFC capturadas. Por otro lado, no se obtienen resultados que indiquen una mejor captura con el conjugado MNP-siferóforo con respecto al resto de nanopartículas.

4.3) Estudio del efecto de la fuerza iónica

A partir del cultivo bacteriano de *Y. enterocolitica*, con una concentración aproximada de 6×10^8 UFC / mL en medio LB con 2,2'-bipiridil, se preparó una dilución 1:100 y para estudiar el efecto de la variable fuerza iónica, se añadieron 100 μ g de cada MNP, a TA, y se dejaron interactuar durante 30 minutos en tampón PBS NaCl 0.14 M ó PBS NaCl 0.5 M. Una vez transcurrido el tiempo de interacción, se recuperaron los agregados (MNPs-bacterias) mediante atracción magnética con un imán, se realizaron 2 lavados con tampón PBS NaCl 0.14 M y finalmente se sembraron en placas TSA diluciones decimales seriadas de esta suspensión, que fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas para el posterior recuento de colonias (UFC / mL). Los resultados se muestran en la **Figura 11**.

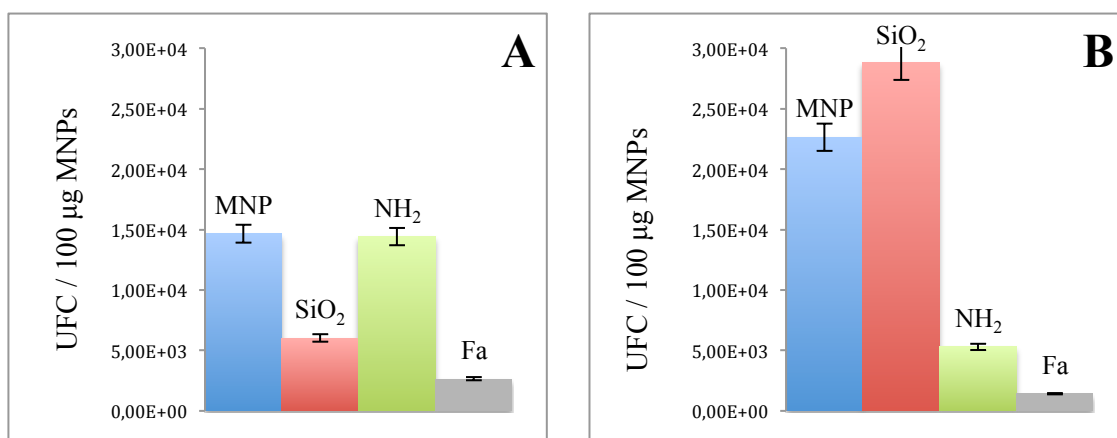


Figura 11. Resultados del ensayo de interacción MNPs-bacterias variando la fuerza iónica, con 100 μ g de MNPs, a TA, y durante 30 minutos. A) con PBS 0.14 M, B) con PBS 0.5 M.

El estudio de esta variable se basa en la idea de que a mayor fuerza iónica, mayor posibilidad de interacción bacterias-MNPs. Esto sería posible siguiendo la hipótesis de la doble capa eléctrica, que indica que cuando hay iones en solución éstos son atraídos por la carga opuesta y así continuamente hasta generar una doble capa, con carga neta positiva o negativa. Pero, al aumentar los iones en solución (como ocurre al utilizar el PBS NaCl 0.5 M) los aniones y cationes interactúan entre sí, en vez de con la partícula principal, que sería el

sideróforo de la MNP en este caso. Así, los sideróforos tendrían menos interferencias por atracción de cargas y en principio se podrían unir al receptor bacteriano más fácilmente, lo que se traduciría finalmente en una mayor captación bacteriana por parte de las MNPs.

Por tanto, aumentando la fuerza iónica 5 veces con el tampón PBS a una concentración de NaCl 0.5 M, en vez del habitual de 0.14 M, se trata de averiguar si se produce alguna modificación en las membranas de las paredes bacterianas con respecto a la unión a las MNPs que implique cambios relevantes.

Se observa que al aumentar la cantidad de iones en solución (**Figura 11B**) disminuye la interacción con $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ y aún mas con el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$. Lo que interactúa con el conjugado, aunque sea poco ($1,42 \times 10^3$ UFC / mL), en realidad es positivo para el experimento porque significa que la interacción está siendo específica con el sideróforo, disminuyéndose las interacciones electrostáticas. Por otro lado, aumenta ligeramente la afinidad (**Figura 11B**) utilizando las nanopartículas MNP ($2,26 \times 10^4$ UFC / mL) y, sobre todo, la MNP@SiO_2 ($2,88 \times 10^4$ UFC / mL), acercándose más a lo esperado en teoría en estas condiciones.

En ambas situaciones de fuerza iónica, el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$ es el que menos interacción con las bacterias muestra en relación con las demás MNPs, pero no excesivamente inferior. Además, el cambio de la variable parece no alterar de forma destacable la interacción entre bacterias y nanopartículas, ni al comparar la MNP unida al sideróforo con las demás, ni entre las otras MNPs, pero sí resultan interesantes los cambios producidos porque en principio podrían estar indicando una tendencia a una mayor especificidad a mayor fuerza iónica, lo que podría tenerse en cuenta para iniciar futuros estudios.

4.4) Estudio del efecto de la concentración de MNPs

A partir del cultivo bacteriano de *Y. enterocolitica*, con una concentración aproximada de 6×10^8 UFC / mL en medio LB con 2,2'-bipiridil, se preparó una dilución 1:100 y, para estudiar el efecto de la variable concentración de nanopartículas, se añadieron 50 μ g, 100 μ g, 200 μ g ó 300 μ g de cada nanopartícula en tampón PBS, a TA y se dejaron interactuar durante 30 minutos. Una vez transcurridos este tiempo de interacción, se recuperaron los agregados (MNPs-bacterias) mediante atracción magnética con un imán, se realizaron 2 lavados con tampón PBS y finalmente se sembraron en placas TSA diluciones decimales seriadas de esta suspensión, y se incubaron a 37 °C durante 24 horas para el posterior recuento de colonias (UFC / mL). Los resultados obtenidos en este caso se muestran en la **Figura 12**.

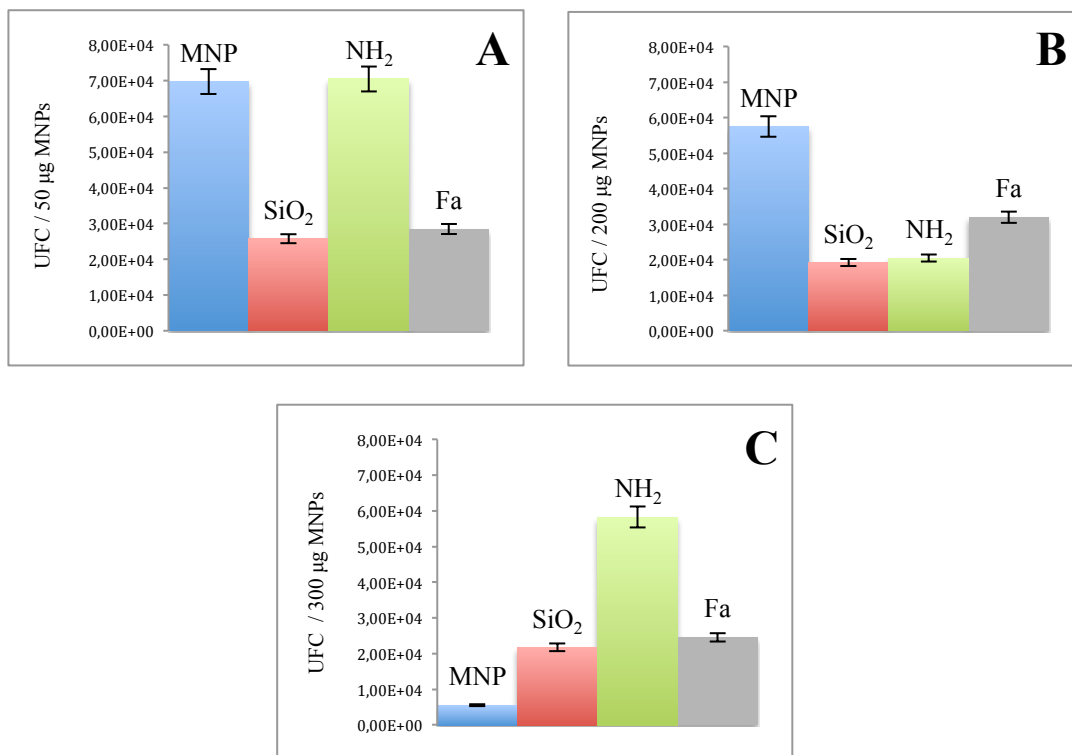


Figura 12. Resultados del ensayo de interacción MNPs-bacterias variando la concentración de nanopartículas, en tampón PBS, a TA y durante 30 minutos. A) con 50 μ g de MNPs, B) con 200 μ g de MNPs, C) con 300 μ g de MNPs.

En este caso, se observa una cierta mejora de interacción con el conjugado $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2\text{@Fa}$ respecto a los anteriores experimentos, pero apenas se modifica entre las distintas concentraciones de nanopartículas utilizadas, capturando en los tres casos un rango de $2\text{-}3 \times 10^4$ UFC / mL.

Al comparar los resultados entre el uso de 50 μg (**Figura 12A**) y 200 μg (**Figura 12B**) se ve que no hay variaciones importantes. Tanto MNP ($6,98 \times 10^4$ UFC / mL usando 50 μg y $5,75 \times 10^4$ UFC / mL usando 200 μg) como MNP@SiO_2 ($2,58 \times 10^4$ UFC/ mL usando 50 μg y $1,92 \times 10^4$ UFC / mL usando 200 μg) y como $\text{MNP@SiO}_2\text{@NH}_2$ ($7,05 \times 10^4$ UFC/ mL usando 50 μg y $2,05 \times 10^4$ UFC / mL usando 200 μg) mantienen un orden de captura de bacterias muy similar. En el caso del uso de 300 μg (**Figura 12C**) MNP aparece con un orden de captura bastante menor ($5,58 \times 10^3$ UFC / mL), lo que en principio se debe probablemente a un error experimental. El resto de nanopartículas mantienen valores similares en esta condición.

Por tanto, en general se ve que no hay cambios destacables en la captura bacteriana al variar la cantidad de nanopartículas, lo que en principio permitiría utilizar en otros experimentos la menor cantidad de nanopartículas posible. Sería interesante estudiar en un futuro otro rango de concentraciones que sí aumente drásticamente la capacidad de captura o la afinidad entre las MNPs y las bacterias.

5) Conclusiones

- Tras estudiar el efecto del tiempo de interacción, la temperatura, la fuerza iónica y la concentración de cuatro tipos de nanopartículas magnéticas (MNP, MNP@SiO₂, MNP@SiO₂@NH₂ y MNP@SiO₂@NH₂@Fa) en la detección y captura de *Yersinia enterocolitica* WC-A, se ha observado que las modificaciones de estas condiciones no optimizan lo suficiente el proceso, que se mantiene en un orden de captura de $\times 10^{3-4}$ UFC / mL. Los mejores resultados se obtienen a un tiempo de interacción de 10 minutos, a 4 °C, con un tampón PBS NaCl de 0.5 M y con una concentración de nanopartículas de 50 µg.

- La especificidad entre el conjugado MNP@SiO₂@NH₂@Fa y *Yersinia enterocolitica* no se logra aumentar con respecto al resto de nanopartículas en ninguna de las condiciones probadas. Por tanto, sería interesante estudiar modificaciones del sideróforo de forma química que puedan mejorar su especificidad con la bacteria y además, investigarlo en los rangos de condiciones que mejores resultados han proporcionado.

6) Bibliografía

- Arvizo, R. R., Bhattacharya, S., Kudgus, R., Giri, K., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. (2012). Intrinsic Therapeutic Applications of Noble Metal Nanoparticles: Past, Present and Future. *Chem Soc Rev.* 7: 2943-2970.
- Ashtari, P., He, X., Wang, K., Gong, P. (2005). An efficient method for recovery of target ssDNA based on amino-modified silica-coated magnetic nanoparticles. *Talanta.* 67: 548-554.
- Bai, Y., Cui, Y., Paoli, G.C., Shi, C., Wang, D., Zhou, M., Zhang, L., Shi, X. (2016). Synthesis of amino-rich silica-coated magnetic nanoparticles for the efficient capture of DNA for PCR. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 145: 257-266.
- Bohara, R. A., Thorat, N. D., Pawar, S. H. (2016). Role of functionalization: strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. *RSC Adv.* 6: 43989-44012.
- Bohara, R. A., Throat, N. D., Mulla, N. A., Pawar, S. H. (2017). Surface-Modified Cobalt Ferrite Nanoparticles for Rapid Capture, Detection, and Removal of Pathogens: a Potential Material for Water Purification. *Appl Biochem Biotechnol.* 182: 598-608.
- Bohara, R.A., Pawar, S. H. (2015). Innovative Developments in Bacterial Detection with Magnetic Nanoparticles. *Appl Biochem Biotechnol.* 176: 1044-1058.
- Borsa, B. A., Tuna, B. G., Hernandez, F. J., Hernandez, L. I., Bayramoglu, G., Arica, M. Y., Ozalp, V. C. (2016). Staphylococcus aureus detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates. *Biosens. Bioelectron.* 86: 27-32.
- Bottone, E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: The Charisma Continues. *Clin Microbiol Rev.* 10: 257-276.
- Bromberg, L., Chang, E. P., Alvarez-Lorenzo, C., Magariños, B., Concheiro, A., Hatton, A. (2010). Binding of Functionalized Paramagnetic Nanoparticles to Bacterial Lipopolysaccharides And DNA. *Langmuir.* 11: 8829-8835.
- Buzby, J. C., Roberts, T. (2009). The Economics of Enteric Infections: Human Foodborne Disease Costs. *Gastroenterology.* 136: 1851-1862.
- Castillo-Rueda, A., Khosravi-Shahi, P. (2010). Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. *Med Clin.* 10: 452-456.
- Chen, L., Razavi, F. S., Mumin, A., Guo, x., Sham, T., Zhang, J. (2013). Multifunctional nanoparticles for rapid bacterial capture, detection, and decontamination. *RSC Adv.* 3: 2390-2397.
- Chung, H. J., Reiner, T., Budin, G., Min, C., Liong, M., Issadore, D., Lee, H., Weissleder, R. (2011). Ubiquitous Detection of Gram-Positive Bacteria with Bioorthogonal Magnetofluorescent Nanoparticles . *ACS Nano.* 5: 8834-8841.
- Cristea, C., Tertis, M., Galatus, R. (2017). Magnetic Nanoparticles for Antibiotics Detection. *Nanomaterials.* 7, 119.
- Deiss, K., Hantke, K., Winkelmann, G. (1998). Molecular recognition of siderophores: A study with cloned ferrioxamine receptor (FoxA) from *Erwinia herbicola* and *Yersinia enterocolitica*. *BioMetals.* 11: 131-137.
- El-Boubbou, K., Gruden, C., Huang, X. (2007). Magnetic Glyco-nanoparticles: A Unique Tool for Rapid Pathogen Detection, Decontamination, and Strain Differentiation. *J. Am. Chem. Soc.* 129: 13392-13393.

Falcão, J. P., Falcão, D. P. (2006). Importância de *Yersinia enterocolitica* em microbiologia medica. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 27: 9-19.

Gao, X., Shao, M., Xu, Y., Luo, Y., Zhang, K., Ouyang, F. (2016). Non-selective Separation of Bacterial Cells with Magnetic Nanoparticles Facilitated by Varying Surface Charge. *Front Microbiol.* 7: 1891.

Grützkau, A., Hanski, C., Hahn, H., Riecken E. O. (1990). Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut.* 9: 1011-1015.

Gu, H., Ho, P.L., Tsang, K. W. T., Wang, L., Xu, B. (2003). Using Biofunctional Magnetic Nanoparticles to Capture Vancomycin-Resistant Enterococci and Other Gram-Positive Bacteria at Ultralow Concentration. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 15702-15703.

Gurr, J. R., Wang, A. S., Chen, C. H., Jan, K. Y. (2004) Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology.* 213: 66-73.

Hadjipanayis, C. G., Machaidze, R., Kaluzova, M., Wang, L., Schuette, A. J., Chen, H., Wu, X., Mao, H. (2010). EGFRvIII Antibody-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging-Guided Convection-Enhanced Delivery and Targeted Therapy of Glioblastoma. *Cancer Res.* 15: 6303-6312.

Honda, H., Kawabe, A., Shinkai, M., Kobayashi, T. (1998). Development of Chitosan-Conjugated Magnetite for Magnetic Cell Separation. *J. Ferment. Bioeng.* 86: 191-196.

Houhoula, D., Papaparaskevas, J., Zatsou, K., Nikolaras, N., Malkawi, H. I., Mingeot-Leclercq, M., Konteles, S., Koussisis, S., Tsakris, A., Charvalos, E. (2017). Magnetic nanoparticle-enhanced PCR for the detection and identification of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis*. *New Microbiol.* 40: 165-169.

Huang, Y.-F., Wang, Y.-F., Yan, X.-P. (2010). Amine-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Rapid Capture and Removal of Bacterial Pathogens. *Environ. Sci. Technol.* 44: 7908-7913.

Hussain, S. M., Hess, K. L., Gearhart, J. M., Geiss, K. T., Schlager, J. J. (2005) *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. In Vitro.* 7: 975-983.

Huy, T. Q., Chung, P. V., Thuy, N. T., Blanco-Andujar, C., Thanh, N. T. K. (2014). Protein A-conjugated iron oxide nanoparticles for separation of *Vibrio cholerae* from water samples. *Faraday Discuss.* 175: 73-82.

Jeng, H. A., Swanson, J. (2006). Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 41: 2699-2711.

Jin, Y., Liu, F., Shan, C., Tong, M., Hou, Y. (2014). Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles. *Water Research.* 50: 124-134.

Joo, J., Yim, C., Kwon, D., Lee, J., Shin, H. H., Cha, H. J., Jeon, S. (2012). A facile and sensitive detection of pathogenic bacteria using magnetic nanoparticles and optical nanocrystal probes. *Analyst.* 137: 3609-3612.

Kaittanis, C., Naser, S. A., Perez, J. M. (2007). One-Step Nanoparticle-Mediated Bacterial Detection with Magnetic Relaxation. *Nano Lett.* 2:380-383.

Kale, S.N., Jadhav, A. D., Verma, S., Koppikar, S. J., Kaul-Ghanekar, R., Dhole, S. D., Ogale, S. B. (2012). Characterization of biocompatible NiCo₂O₄ nanoparticles for applications in hyperthermia and drug delivery. *Nanomedicine.* 4:452-9.

Kearns, H., Goodacre, R., Jamieson, L., Graham, D., Faulds, K. (2017). SERS Detection of Multiple Antimicrobial Resistant Pathogens using Nanosensors. *Anal. Chem.* 23: 12666-12673.

- Kell, A. J., Stewart, G., Ryan, S., Peytavi, R., Boissinot, M., Huletsky, A., Bergeron, M. G., Simard, B. (2008). Vancomycin-Modified Nanoparticles for Efficient Targeting and Preconcentration of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *ACS Nano*. 2: 1777-1788.
- Kim, Y., Lyvers, D.P., Wei, A., Reifenberg, R. G., Low, P.S. (2012). Label-free detection of a bacterial pathogen using an immobilized siderophore, deferroxamine. *Lab Chip*. 12: 971-976.
- Lam, C. W., James, J. T., McCcluskey, R., Hunter, R. L. (2004) Pulmonary toxicity of single- wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci*. 77: 126-134.
- Lan, L., Yao, Y., Ping, J., Ying, Y. (2017). Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosens. Bioelectron*. 91: 504-514.
- Laurent, S., Dutz, S., Häfeli, U. O., Mahmoudi, M. (2011). Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 166: 8-23.
- Liana, A. E., Marquis, C.P., Gunawan, C., Gooding, J.J., Amal, R. (2017). T4 bacteriophage conjugated magnetic particles for *E. coli* capturing: Influence of bacteriophage loading, temperature and tryptone. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 151: 47-57.
- Liu, J.-C., Chen, W.-J., Li, C.-W., Tony Mong, K.-K., Tsai, P.-J., Tsai, T.-L., Lee, Y., Chen, Y.-C. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* using functional magnetic nanoparticle-based affinity capture combined with MALDI MS analysis. *Analyst*. 134: 2087-2094.
- Mamani, J. B., Gamarra, L. F., de Souza Brito, G. E. (2014). Synthesis and Characterization of Fe₃O₄ Nanoparticles with Perspectives in Biomedical Applications. *Mat. Res*. 3: 542-549.
- Meng, X., Seton, H.C., Lu, T., Prior, I. A., Thanh, N. T., Song, B. (2011) Magnetic CoPt nanoparticles as MRI contrast agent for transplanted neural stem cells detection. *Nanoscale*. 3:977-84.
- Mezger, A., Fock, J., Antunes, P., Osterberg, F. W., Boisen, A., Nilsson, M., Hansen, M. F., Ahlford, A., Donolato, M. (2015). Scalable DNA-Based Magnetic Nanoparticle Agglutination Assay for Bacterial Detection in Patient Samples. *ACS Nano*. 9:7374-7382.
- Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., Wilczewska, A. Z. (2012). Magnetic nanoparticles as new diagnostic tools in medicine. *Adv Med Sci*. 2:196-207.
- Ozalp, V. C., Bayramoglu, G., Kavruk, M., Keskin, B. B., Oktem, H. A., Arica, M. Y. (2014). Pathogen detection by core-shell type aptamer-magnetic preconcentration coupled to real-time PCR. *Anal Biochem*. 447: 119-125.
- Pan, Y., Du X., Zhao F., Xu B. (2012). Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells. *Chem Soc Rev*. 41: 2912-2942.
- Smolensky, E. D., Park, H.Y., Berquó, T. S., Pierre, V. C. (2011) Surface functionalization of magnetic iron oxide nanoparticles for MRI applications—effect of anchoring group and ligand exchange protocol. *Contrast Media Mol Imaging*. 4:189-199.
- Taylor, J. I., Hurst, C. D., Davies, M. J., Sachsinger, N., Bruce, I. J. (2000). Application of magnetite and silica-magnetite composites to the isolation of genomic DNA. *J. Chromatogr A*. 890: 159-166.
- Thorat, N. D., Patil, R. M., Khot, V. M., Salunkhe, A. B., Prasad, A. I., Barick, K. C., Ningthoujam, R. S., Pawar, S. H. (2013). Highly water-dispersible surface-functionalized LSMO nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia application. *New J. Chem*. 37: 2733-2742.

Thorat, N. D., Lemine, O. M., Bohara, R. A., Omri, K., El Mir, L., Tofail, S. A. M. (2016). Superparamagnetic iron oxide nanocargoes for combined cancer thermotherapy and MRI applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 18: 21331-21339.

Tuson, H.H., Weibel, D.B. (2013). Bacteria-surface interactions. *Soft Mater.* 9: 4368-4380.

Varshney, M., Yang, L., Su, X.-L., Li, Y. (2005). Magnetic Nanoparticle-Antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *J. Food Prot.* 68: 1804-1811.

Wan, Y., Sun, Y., Qi, P., Wang, P., Zhang, D. (2014). Quaternized magnetic nanoparticles–fluorescent polymer system for detection and identification of bacteria . *Biosens. Bioelectron.* 55: 289-293.

Wang, L., Luo, J., Shan, S., Crew, E., Yin, J., Zhong, C.-J. (2011). Bacterial Inactivation Using Silver-Coated Magnetic Nanoparticles as Functional Antimicrobial Agents. *Anal. Chem.* 83: 8688-8695.

Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., Roach, D. H., Reynolds, G. A., Webb, T. R. (2004) Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 77: 117-125.